



李达,朱婷,刘地,等.不同菌种固态发酵时间对甘草黄酮含量及其抗氧化特性的影响[J].黑龙江农业科学,2025(1):63-68.

不同菌种固态发酵时间对甘草黄酮含量及其抗氧化特性的影响

李达,朱婷,刘地,武晓英

(太原师范学院 生物科学与技术学院,山西 晋中 030619)

摘要:为充分发掘与利用甘草资源,促进发酵甘草的抗氧化研究,选取3种不同菌种(酵母菌、米曲霉菌、黑曲霉菌)发酵的甘草黄酮为研究对象,采用乙醇回流法提取甘草中的黄酮,在甘草30g,接种量10%、发酵温度28℃、含水量80%的条件下,对发酵时间进行单因素优化,优化发酵后提取的甘草黄酮粗提物用D101型大孔吸附树脂进行纯化,并测定其相关的体外抗氧化能力,探究不同菌种固态发酵时间对甘草黄酮含量和抗氧化特性的影响。结果表明,甘草在酵母菌发酵5d、米曲霉菌发酵5d、黑曲霉菌发酵3d时的黄酮含量最高,经大孔树脂纯化后黄酮含量上升,黑曲霉菌发酵组由 $63.8\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 上升为 $90.6\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、米曲霉菌发酵组由 $78.2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 上升为 $101.8\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、酵母菌发酵组由 $54.9\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 上升为 $82.6\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、未发酵组由 $39.6\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 上升为 $57.9\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$;不同菌种发酵甘草后对DPPH及ABTS自由基的清除能力显著高于未发酵甘草,其中米曲霉发酵组的DPPH及ABTS清除力最高。因此,酵母菌、米曲霉、黑曲霉发酵甘草能有效提高黄酮含量,大孔树脂纯化甘草黄酮后黄酮含量显著上升,且具有更好的抗氧化活性。

关键词:甘草黄酮;固体发酵;大孔树脂;抗氧化性;DPPH;ABTS

甘草是一种分布广、利用价值高的药食两用豆科草本植物。新疆、内蒙古、宁夏以及山西是中国主要的产地,同时华北和西北地区也有少量分布。甘草中含有黄酮类、三萜皂苷类、香豆素类、二苯乙烯类、多糖类、有机酸类和生物碱类等多种天然活性成分^[1-4]。其中,黄酮类化合物的含量在甘草药材中大约占3%,已有的研究报道显示,甘草具有许多潜在的药用价值^[5-6],有抑菌、抗癌、抗辐射、抗心律失常、抗病毒、利胆、强心、镇静和镇痛等治疗功效^[7],还有抗氧化、抗炎、免疫调节的保健功能,同时也有抑制黄褐斑、美白的美容功效。

发酵是一种用于中药的加工方法。通过微生物的作用,在适当的温度、湿度和水分条件下对药材进行发酵,以增强其原有特性或产生新的效果。益生菌发酵草药具有使用纯菌株、可控过程以及在发酵过程中通过其转化作用增加生物活性成分的特点^[8-10]。例如,Dey等^[11]和Xu等^[12]的研究表明真菌发酵可以提升谷物的抗氧化潜力,Araújo等^[13]研究表明两种真菌在未经处理的水果皮上生长之后增加了它们的蛋白质含量和抗氧化活性。

Meng等^[14]研究表明黑曲霉可以从植物生物质中生产木糖醇。

黄酮类化合物可以从甘草中通过多种途径提取,其中包括碱性水溶液提取法、有机溶剂提取法、超声辅助提取法。但基本原理是利用有效的方法破坏甘草细胞结构,再根据甘草黄酮在极性和溶解方面的不同特性进行有目标的提取和分离。为了提高甘草黄酮的纯度,在提取过程中需进行纯化处理^[15-18]。大孔吸附树脂法是最为常用的纯化技术,因其独有的理化性质和很强的稳定性,不仅不受无机盐类、强离子及低分子化合物的干扰,而且其内部的多孔性结构对不同物质可以进行有效分离和富集,能够精准筛选出目标黄酮类化合物^[19]。

甘草作为药食同源的常用药材,本研究以甘草黄酮为研究对象,将甘草经过不同菌种发酵后,通过乙醇回流法提取黄酮并纯化,采用清除自由基能力的比较来探究发酵对其抗氧化活性的影响,本研究旨在充分发掘与利用甘草这一珍贵资源,为发酵甘草的抗氧化研究提供理论基础和实践指导。

收稿日期:2024-09-15

基金项目:山西省基础研究计划项目(20210302123317);山西省中兽药技术创新中心。

第一作者:李达(1997-),男,硕士研究生,从事天然产物制备和功能产品开发研究。E-mail:1033606477@qq.com。

通信作者:武晓英(1973-),女,博士,教授,从事天然产物制备和功能产品开发研究。E-mail:wuxy@tynu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

甘草饮片,山西瑞象生物药业有限公司;黑曲霉, BNCC 公司, 编号 BNCC186380; 米曲霉, BNCC 公司, 编号 BNCC338380; 酵母菌, 安琪公司; 芦丁标准样品, 飞静生物; 亚硝酸钠, 永大试剂; 硝酸铝, 恒兴试剂; 氢氧化钠, 恒兴试剂; 氯化钠, 天津光复精细化工研究所; 酵母膏葡萄糖 (YPD) 琼脂培养基 (酵母浸膏, 天津光复精细化工研究所; 蛋白胨, 索莱宝; 无水葡萄糖, 天津光复精细化工研究所); 马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基, 索莱宝; 无水乙醇, 致远化学试剂有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH), 阿拉丁; 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS), 阿拉丁; 无水甲醇, 致远化学试剂有限公司; D101 型大孔吸附树脂, 索莱宝; 所有分离用有机溶剂均为国产分析纯。

生化培养箱 SPX-250B-Z 型, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 高速多功能粉碎机, 永康市红太阳机电有限公司; 可见分光光度计 V-1100D 型, 上海美谱达仪器有限公司; 高速离心机 HC-3018、HC-3018R, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; 普通层析柱 35 cm×40 cm, 北京瑞达恒辉科技发展有限公司; DBS-100 电脑全自动部份收集器, 上海浦西分析仪器厂有限公司; 洁净工作台 JB-CJ-1000FX, 苏州佳宝净化工程设备有限公司。

1.2 方法

本研究于 2024 年 4 月 1 日在太原师范学院生物科学与技术学院格物楼 613 天然产物活性成分创新兽药工程技术中心开始发酵工作, 最终于 2024 年 6 月下旬完成本研究。

1.2.1 菌种活化与菌液稀释 配制 PDA 和 YPD 固体培养基, 将米曲霉、黑曲霉涂布于 PDA 培养基, 酵母菌涂布于 YPD 培养基, 28 °C 培养 5 d。培养完成后, 将培养基划开, 放入离心管, 加入少量生理盐水, 震荡, 洗脱米曲霉、黑曲霉孢子, 得到高浓度混悬液, 将混悬液通过无菌脱脂棉花过滤, 除去混入悬液中的菌丝体, 得到孢子悬液。用生理盐水冲洗培养基上酵母菌菌落, 得到酵母菌菌悬液, 3 种菌液分别稀释后放置冰箱中待用。

1.2.2 发酵条件的单因素试验 将甘草饮片用粉碎机粉碎后, 过 60 目筛进行发酵, 30 g 甘草中

分别接种 10% 的不同菌种, 控制发酵温度 28 °C、含水量 80%, 分别考察发酵时间 (1, 3, 5 和 7 d)、菌种 (酵母菌、黑曲霉、米曲霉) 对甘草总黄酮含量的影响。根据试验结果, 选择合适发酵天数进行后续大量发酵并纯化。

1.2.3 黄酮标准曲线绘制 配制 0.5 mg·mL⁻¹ 的芦丁的标准品溶液, 梯度稀释为 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 和 400 μg·mL⁻¹ 的芦丁溶液, 分别精密量取 6 mL 各稀释梯度芦丁溶液于 25 mL 容量瓶中, 加入 1 mL 5% 的亚硝酸钠溶液, 混匀, 静置 6 min。再添加 1 mL 10% 的硝酸铝溶液, 反应 6 min。添加 4% 的氢氧化钠溶液 10 mL, 最后用 70% 的乙醇溶液定容静置 15 min。以无水乙醇为空白对照, 利用紫外可见分光光度计在波长 510 nm 处测定吸光度, 以吸光度值 A 为纵坐标、芦丁浓度 C (μg·mL⁻¹) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得吸光度 A 与芦丁浓度 C (mg·mL⁻¹) 之间的线性回归方程式为: $Y = 0.0028X - 0.0024$, 相关系数为 0.9999。

1.2.4 甘草总黄酮提取及含量测定 采取乙醇回流提取法进行提取, 保持 80 °C 的提取温度, 以 3:7 的比例混合水和乙醇, 按照 1:15 的料液比, 回流提取 1 h。采用 NANO₂-AL(NO₃)₃ 比色法黄酮含量测定^[20]。

1.2.5 大孔吸附树脂纯化甘草黄酮 大孔树脂预处理: 采用 D101 型树脂^[21], 先用 4% 盐酸洗脱过树脂, 放置于摇床 120 r·min⁻¹ 处理 2 h, 取出用蒸馏水冲洗抽滤至中性。再用 4% 氢氧化钠洗脱过树脂, 放置于摇床 120 r·min⁻¹ 处理 2 h, 取出用蒸馏水冲洗抽滤至中性。最后用无水乙醇洗脱过树脂, 放置于摇床 120 r·min⁻¹ 处理 2 h, 取出用蒸馏水冲洗抽滤至无醇味, 备用。

泄露曲线检测: 称取 140 g 预处理后的 D-101 大孔树脂湿法装柱, 计算柱体积 (Bed Volume, BV = 70 mL) 后, 以甘草黄酮上样浓度为 0.9 mg·mL⁻¹, 流速设定 2 BV·h⁻¹, 每 7 mL 收集 1 管, 测定黄酮含量, 并绘制泄露曲线, 以此来确定最佳上样条件。

动态洗脱试验: 选取最佳上样条件上样, 待吸附饱和后分别用蒸馏水和 80% 乙醇作为洗脱液冲洗树脂至洗脱液无色, 流速 2 BV·h⁻¹, 每 7 mL 收集 1 管, 测定黄酮含量, 绘制洗脱曲线。

甘草黄酮粗提物纯化:以最佳上样条件,水洗体积,醇洗体积对未发酵、黑曲霉、米曲霉、酵母菌的甘草黄酮粗提物进行纯化,收集醇洗洗脱液,将洗脱液转移至旋转蒸发仪内蒸至无醇味,于低温冷冻干燥机中干燥 48 h,得甘草总黄酮纯化物。用 70%乙醇复溶,测定 510 nm 处吸光度计算其中黄酮含量。

1.2.6 DPPH 测定 将 0.007 9 g DPPH 加入无水甲醇中,定容至 100 mL,将定容好的 DPPH 溶液稀释为 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 待用。取大孔吸附树脂纯化后的甘草黄酮提取物,配制 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的黄酮样品溶液,移取 $80 \mu\text{L}$ 定容至 0.3 mL,将 0.3 mL 的样品溶液与 2.7 mL 稀释好的 DPPH 溶液混匀并按照如下的分组 A0:0.3 mL 去离子水+2.7 mL DPPH 溶液。As:0.3 mL 样品溶液+2.7 mL DPPH 溶液。Ar:0.3 mL 样品溶液+2.7 mL 无水甲醇溶液。配制好之后,黑暗常温反应 30 min,以无水甲醇为空白参照,在 518 nm 处测吸光度。并计算 DPPH 清除率(Y),计算公式如下:

$$Y(\%) = \left(\frac{A_s - A_r}{A_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

1.2.7 ABTS 测定 将 $7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABTS 和 $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过硫酸钾溶液,在室温条件下等体积混合,并置于暗处反应 12~16 h,获得 ABTS+ 溶液。将获得的 ABTS+ 溶液以 80%乙醇稀释,使其 734 nm 下的吸光度为 0.7。取大孔吸附树脂纯化后的甘草黄酮提取物,配制 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的黄酮样品溶液,移取 $10 \mu\text{L}$ 定容至 0.3 mL,按照如下方式加样,A0:0.3 mL 去离子水+2.7 mL ABTS+ 溶液;As:0.3 mL 样品溶液+2.7 mL ABTS+ 溶液;Ar:0.3 mL 样品溶液+2.7 mL 无水乙醇溶液。黑暗常温反应 30 min,以无水乙醇为空白参照,在 734nm 处测吸光度。并参照公式(1),计算 ABTS 清除率。

1.3 数据分析

采用 SPSS 23 软件进行统计分析,并借助 Graphpad Prism 9 和 Origin 2021 绘制结果图。

2 结果与分析

2.1 不同菌种和发酵时间对甘草黄酮含量的影响

由图 1 可知,未发酵组 1~7 d 黄酮浓度基本保持不变($P>0.05$);酵母菌组甘草发酵 3 d、5 d

的黄酮浓度显著高于发酵 1 d 和 7 d 的($P<0.05$),酵母菌组甘草发酵 3 d 和 5 d 之间黄酮含量差异不显著($P>0.05$);米曲霉组甘草发酵 5 d 后黄酮浓度显著高于发酵 1 d、3 d 和 7 d ($P<0.05$);黑曲霉组甘草发酵 3 d、5 d、7 d 后的黄酮浓度显著高于发酵 1 d 组($P<0.05$),发酵 3 d、5 d 和 7 d 处理间黄酮浓度差异不显著($P>0.05$)。

米曲霉组甘草发酵 1 d 的黄酮含量显著高于未发酵组和黑曲霉组($P<0.05$);酵母菌、米曲霉、黑曲霉组甘草发酵 3 d、5 d 的黄酮含量显著高于未发酵组($P<0.05$);黑曲霉组甘草发酵 7 d 的黄酮含量显著高于未发酵组和酵母菌、米曲霉处理($P<0.05$)。综上所述,不同菌种发酵甘草的最佳时间条件为酵母菌 5 d,米曲霉 5 d,黑曲霉 3 d。

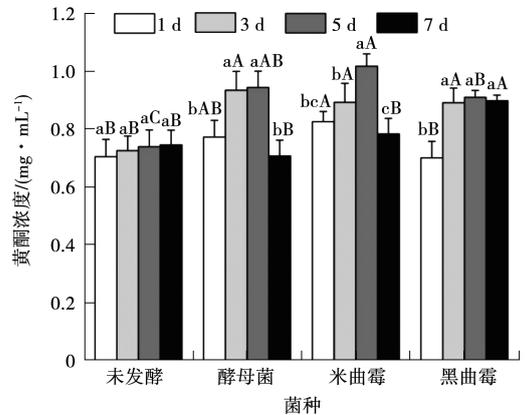


图 1 不同发酵菌种和发酵时间对黄酮含量的影响

注:不同小写字母代表同一菌种不同发酵时间处理间差异显著($P<0.05$)。不同大写字母表示同一发酵时间不同菌种间差异显著($P<0.05$)。下同。

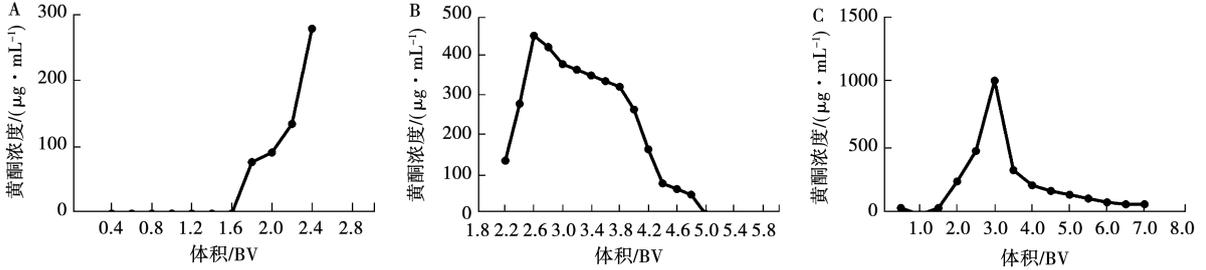
2.2 大孔吸附树脂纯化甘草黄酮效果

2.2.1 大孔吸附树脂纯化甘草黄酮的优化条件 样品洗脱泄露曲线结果如图 2A 所示,当上样浓度为 $0.9 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 且洗脱体积达到 2.2 BV 时,洗脱液中黄酮含量达到上样浓度的 20%即达到泄漏点,此时大孔树脂吸附饱和之后样品会发生泄露,所以最佳上样体积为 2.2 BV。

水洗除杂,是利用黄酮不亲水而杂质亲水的特性,通过水洗去杂质的过程,水洗除杂曲线如图 2B 所示,黄酮吸附量随着水洗液体积的增加呈现出先上升后下降并最终为 0 的趋势,当水洗体积在 2.6 BV 时,一小部分的黄酮以及大量的杂质

被有效地从洗脱剂中洗出,此时黄酮吸附量最低;随着水洗体积的继续增加,当达到 5.0 BV 时,水洗液中黄酮含量降为 0,此时大孔吸附树脂所吸附

的黄酮含量趋于稳定,故从泄漏点开始算起的 2.2 BV 体积到最终的 5.0 BV 之间一共有 2.9 BV 的体积,故选取 2.9 BV 为最佳水洗体积。



A. 泄露曲线;B. 水洗除杂体积曲线;C. 醇洗体积曲线。
图 2 泄露曲线、水洗除杂体积曲线和醇洗体积曲线

醇洗是指在水洗除杂之后,利用一定浓度的乙醇溶液把大孔吸附树脂之内的黄酮洗脱出来的过程。醇洗曲线如图 2C 所示,随着醇体积的增加样品中的黄酮逐渐被洗出,呈现先上升后下降并趋于稳定,其中当到达 3.0 BV 时洗脱液中黄酮含量最大,黄酮大量被洗出。当达到 6.5 BV 时黄酮含量趋于稳定,之后无变化,说明 3.0 BV 为最佳醇洗体积。

黑曲霉组 ($P < 0.05$)。因此,甘草发酵后清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力提高,抗氧化活性增强,且以米曲霉处理为最佳。

2.2.2 发酵甘草黄酮纯化前后含量的比较 由表 1 可知,纯化后样品中黄酮含量较纯化前含量上升,未发酵处理由 $39.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 上升为 $57.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。酵母菌由 $54.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 上升为 $82.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,米曲霉由 $78.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 上升为 $101.8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,黑曲霉由 $63.8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 上升为 $90.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

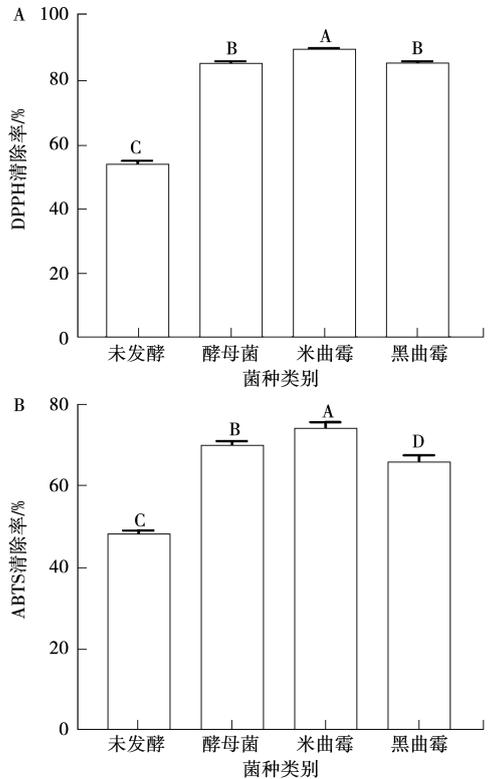


图 3 不同菌种发酵甘草黄酮对 DPPH(A) 和 ABTS(B) 的清除率

表 1 发酵甘草黄酮纯化前后黄酮含量比较

组别	黄酮含量/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	
	纯化前	纯化后
未发酵	39.6	57.9
黑曲霉	63.8	90.6
米曲霉	78.2	101.8
酵母菌	54.9	82.6

2.3 发酵甘草黄酮的抗氧化性比较

甘草发酵前后在相同浓度下对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力结果如图 3 所示,米曲霉、黑曲霉、酵母菌发酵甘草组对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除率显著高于未发酵组 ($P < 0.05$),且米曲霉组显著高于黑曲霉、酵母菌组 ($P < 0.05$)。图 3A 显示,黑曲霉和酵母菌发酵甘草对 DPPH 的清除力无显著性差异 ($P > 0.05$),图 3B 显示,酵母菌发酵甘草组清除 ABTS 的能力显著高于

3 讨论

微生物发酵技术可以利用合适的温度、pH 和接种量等条件,将中草药作为基质进行发酵。在发酵过程中,微生物会释放很多种不同效果的酶,催化药材产生化学反应生成多种初级、次级代

谢产物^[22]。并且由于微生物的作用,部分药材会经历酯化等多种生物化学反应过程,进而生成全新的活性物质^[23-24]。这些新的物质不仅丰富了中药材的化学成分,也极大地扩展了其药用范围,使其得以应用于更多疾病的治疗^[25]。本研究采用米曲霉、黑曲霉、酵母菌发酵甘草,甘草中黄酮的含量显著增加,且影响黄酮含量的最佳发酵时间条件为酵母菌 5 d,米曲霉 5 d,黑曲霉 3 d。

甘草黄酮因含有酚羟基的结构,能够与一些自由基发生反应,所以具有抗氧化特性。近年来,甘草黄酮因在化妆品行业和保健品行业的广泛应用,受到众多消费者的喜爱。自由基因其高度的不稳定性和极高的化学活性,易与活细胞内的物质发生反应,这种反应过程会对机体造成一系列的损害,影响细胞的正常功能和机体的健康。最近一项研究显示发酵技术可以帮助人体预防自由基相关的疾病,例如 Jakubczyk 等^[26]的研究指出无盐发酵甜菜根汁具有预防自由基疾病相关的潜在有益健康特性。而直接影响发酵结果的发酵参数也需要不断地优化才可以获得更好的发酵效果,发酵的时间、温度、菌种的选择都是很重要的指标,例如 Vaitkeviciene 等^[27]研究指出优化发酵参数可以提高柳叶中糖和光合色素的含量。

越来越多的真菌菌株已用于工业生产,扩大了发酵产品特性的多样性^[28]。Zhang 等^[29]研究认为发酵中草药是一种良好的猪生长饲料添加剂,对猪的免疫力有正面作用。Shakya 等^[30]研究得出益生菌发酵显著提高了薄荷提取物的生物活性。本研究通过不同菌种发酵甘草经纯化后,采用 DPPH 和 ABTS 检测甘草黄酮对自由基的清除能力,研究结果与前人一致,甘草黄酮含量在增加的同时,抗氧化活性也显著增加,不同菌种发酵甘草的组别都显著高于未发酵组($P < 0.05$),且米曲霉组显著高于黑曲霉、酵母菌组($P < 0.05$)。

4 结论

本研究采用乙醇回流提取法提取甘草中的黄酮,利用时间单因素优化不同菌种发酵甘草的条件,将甘草黄酮粗提物用 D101 型大孔吸附树脂纯化,纯化后样品中黄酮含量较未发酵组都显著提高,抗氧化试验结果也表明,发酵后甘草中黄酮对 DPPH 和 ABTS 自由基具有良好的清除能力。本试验证实了甘草经过发酵有效提高了黄酮含

量,并且可以增强黄酮对自由基的清除能力,黄酮抗氧化能力的提高将对医药、保健品,以及化妆品产业的产品开发和利用提供有价值的参考,对于高效、合理地利用甘草资源具有一定的理论指导意义。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第二十五卷. 第一分册[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 马鸿雁, 邓雨娇, 马倩, 等. 甘草的研究概况[J]. 中药与临床, 2018, 9(1): 59-62.
- [4] ZHANG Q Y, YE M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice) [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(11): 1954-1969.
- [5] 邓桃妹, 彭灿, 彭代银, 等. 甘草化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的探讨[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2660-2676.
- [6] 崔永明. 甘草黄酮的分离鉴定、药效及其指纹图谱研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2008.
- [7] 王世苗, 张晓妍, 李紫薇. 甘草黄酮提取分离及药理活性研究进展[J]. 伊犁师范大学学报(自然科学版), 2021, 15(4): 35-42.
- [8] LI L, WANG L, FAN W X, et al. The application of fermentation technology in traditional Chinese medicine: a review[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2020, 48(4): 899-921.
- [9] YANG H Y, HAN L, LIN Y Q, et al. Probiotic fermentation of herbal medicine: progress, challenges, and opportunities [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2023, 51(5): 1105-1126.
- [10] CUI R, ZHANG C, PAN Z H, et al. Probiotic-fermented edible herbs as functional foods: a review of current status, challenges, and strategies [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2024, 23(2): e13305.
- [11] DEY T B, KUHAD R C. Upgrading the antioxidant potential of cereals by their fungal fermentation under solid-state cultivation conditions [J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 59(5): 493-499.
- [12] XU L N, GUO S, ZHANG S W. Effects of solid-state fermentation with three higher fungi on the total phenol contents and antioxidant properties of diverse cereal grains [J]. FEMS Microbiology Letters, 2018, 365(16). DOI: 10.1093/femsle/fny163.
- [13] ARAÚJO L P, VILELA H, SOLINHO J, et al. Enrichment of fruit peels' nutritional value by solid-state fermentation with *Aspergillus ibericus* and *Rhizopus oryzae* [J]. Molecules, 2024, 29(15): 3563.
- [14] MENG J L, CHROUMPI T, MÄÄKELÄM R, et al. Xylitol production from plant biomass by *Aspergillus niger*

- through metabolic engineering [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 344: 126199.
- [15] 韩雅慧,陶宁萍.甘草黄酮提取及其抗氧化能力测定方法研究进展[J].山西农业科学,2010,38(11):89-93.
- [16] 但建明,李文娟,洪成林,等.甘草渣中黄酮类化合物的提取工艺研究[J].石河子大学学报(自然科学版),2004,22(5):427-428.
- [17] 万嘉洋,丁志山,张宇燕,等.甘草中黄酮类成分提取工艺的优化研究[J].中华中医药学刊,2016,34(10):2326-2328.
- [18] 李金芳,张书源,崔洁,等.超声辅助提取新疆甘草总黄酮工艺研究[J].山西化工,2022,42(6):14-16.
- [19] 龚丽霞.甘草中黄酮类化合物的提取和纯化研究[D].上海:上海大学,2009.
- [20] 冯薇,王文全,赵平然.甘草总黄酮含量测定方法研究[J].时珍国医国药,2007,18(11):2608-2610.
- [21] 邓丽.甘草渣中黄酮类化合物的提取纯化、分离鉴定及其抑菌活性研究[D].兰州:兰州理工大学,2011.
- [22] TEREFE N S, AUGUSTIN M A. Fermentation for tailoring the technological and health related functionality of food products[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(17): 2887-2913.
- [23] 袁媛,王亚君,孙国平,等.中药灵芝使用的起源考古学[J].科学通报,2018,63(13):1180-1188.
- [24] 李艳凤,翟梦颖,李雨昕,等.发酵法在中药研究中的应用[J].医学综述,2020,26(4):753-757.
- [25] 谷海水,谷卫华.微生物技术在中药炮制中的运用[J].中医临床研究,2015,7(24):29-30.
- [26] JAKUBCZYK K, MELKIS K, JANDA-MILCZAREK K, et al. Phenolic compounds and antioxidant properties of fermented beetroot juices enriched with different additives [J]. *Foods*, 2023, 13(1): 102.
- [27] VAITKEVICIENE N, JARIENE E, KULAITIENE J, et al. Effect of solid-state fermentation on vitamin C, photosynthetic pigments and sugars in willow herb (*Chamerion angustifolium* (L.) holub) leaves[J]. *Plants*, 2022, 11(23): 3300.
- [28] GÄNZLE M G, MONNIN L, ZHENG J S, et al. Starter culture development and innovation for novel fermented foods[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2024, 15(1): 211-239.
- [29] ZHANG J H, SHU Z H, LV S X, et al. Fermented Chinese herbs improve the growth and immunity of growing pigs through regulating colon microbiota and metabolites[J]. *Animals*, 2023, 13(24): 3867.
- [30] SHAKYA S, DANSHIITSOODOL N, NODA M, et al. Role of phenolic acid metabolism in enhancing bioactivity of *Mentha* extract fermented with plant-derived *Lactobacillus plantarum* SN13T [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2024, 16(3): 1052-1064.

Effects of Solid-State Fermentation Time of Different Bacterial Strains on Content and Antioxidant Properties of Licorice Flavonoids

LI Da, ZHU Ting, LIU Di, WU Xiaoying

(College of Biological Science and Technology, Taiyuan Normal University, Jinzhong 030619, China)

Abstract: In order to fully explore and utilize licorice resources and promote the antioxidant research of fermented licorice, three different probiotics (yeast, *Aspergillus oryzae*, and *Aspergillus niger*) were selected as the research objects to ferment flavonoids in licorice. Ethanol reflux method was used to extract flavonoids from licorice, and single factor experiments were conducted to optimize the fermentation time under the fixed conditions of inoculation volume of 10%, fermentation temperature of 28 °C, water content of 80%, and 30 g of licorice. Based on the optimal fermentation time, the crude extract of licorice flavonoids was purified using D101 macroporous adsorption resin and its related *in vitro* antioxidant capacity was determined. The effect of solid-state fermentation time of different bacterial strains on the content and antioxidant properties of licorice flavonoids was explored. The results showed that the content of flavonoids was highest in yeast fermentation for 5 days, *Aspergillus oryzae* fermentation for 5 days, and *Aspergillus niger* fermentation for 3 days. Therefore, based on this, purification was carried out using macroporous resin, and the flavonoid content increased after purification. *Aspergillus niger* increased from 63.8 mg·g⁻¹ to 90.6 mg·g⁻¹, *Aspergillus oryzae* increased from 78.2 mg·g⁻¹ to 101.8 mg·g⁻¹, yeast increased from 54.9 mg·g⁻¹ to 82.6 mg·g⁻¹, and unfermented increased from 39.6 mg·g⁻¹ to 57.9 mg·g⁻¹; The scavenging ability of different strains of fermented licorice on DPPH and ABTS free radicals was significantly higher than that of unfermented licorice. In summary, there is a significant difference in the flavonoid content of licorice before and after fermentation. After purification with macroporous adsorption resin, the flavonoid content of licorice increases significantly, and licorice has better antioxidant activity after fermentation.

Keywords: Licorice flavonoids; solid state fermentation; macroporous resin; antioxidant activity; DPPH; ABTS